
SARCOSINE AS POSSIBLE TUMOUR MARKER OF PROSTATE TUMOURS - ANALYTICAL STUDY

Cernei N.¹, Zítka O.¹, Sochor J.¹, Adam V.¹, Kizek R.¹

Department of Chemistry and Biochemistry, Faculty of Agronomy, Mendel University in Brno, Zemědělská 1, 613 00 Brno, Czech Republic

E-mail: natalia.cernei3@gmail.com

ABSTRACT

Prostate cancer is in many developed countries the most common type of cancer and the second leading cause of cancer-related death in the male population. The marker of prostate cancer is called prostate specific antigen, PSA, whose small amount is normally secreted by prostatic epithelial cells into the bloodstream. However, increased level of PSA in the blood does not indicate only the presence of prostate cancer, but any abnormality of this gland; it is also very individual and variable. Therefore, many patients are needlessly indicated on other tests that are reliable, but unpleasant. On the other hand, 20% of men with prostate cancer have PSA level in normal. In addition, the PSA level does not identify the degree of tumor aggressiveness. Therefore, particularly in recent years, when the incidence is increasing more and more, science needs to find a reliable marker of prostate cancer and thereby increase the chances for successful treatment. In 2009, scientists examined 1126 substances, which could serve in the future as reliable markers of this disease. The most excellent substance was sarcosine. Its amount increased in many samples proportionally with the disease stage. Another reason, why this substance could be a marker of prostate cancer, is the fact that in urine samples taken from men without prostate cancer did not occur. The main objective of this study was to optimize the method for rapid and reliable determination of sarcosine in various samples, such as lysates of cultivated prostate cells or urine samples and interaction effect on sarcosine. Furthermore, using this method to confirm or refute the possibility of using sarcosine in the diagnostics of prostate cancer.

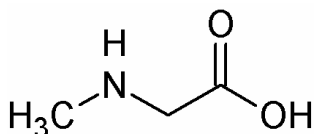
Key words: sarcosine, tumor marker, prostate cancer, interaction effect, high performance liquid chromatography (HPLC)

Acknowledgement: Financial support from the IGA FA MENDELU 1/2011 is highly acknowledged.

ÚVOD

Karcinom prostaty jako maligní nádorové onemocnění prostaty bývá klinicky nejčastěji označován adenokarcinom prostaty, charakterizován abnormálním nekoordinovaným růstem epiteliálních prostatických buněk se ztrátou jejich původní funkce. Jednotný mechanismus vzniku a rozšiřování karcinomu prostaty není dosud znám, pravděpodobně se jedná o soubor různých vlivů. Asi nejhlavnějším faktorem ovlivňujícím vznik karcinomu prostaty je věk, s každou dekadou života roste pravděpodobnost výskytu na dvojnásobek. Nezbytnou podmínkou pro vznik karcinomu prostaty je přítomnost androgenů, mužských pohlavních hormonů vznikajících ve varletech. Dalšími faktory, které pravděpodobně přispívají ke vzniku nádorových onemocnění prostaty, jsou genetické dispozice, riziko výskytu pro syna otce majícího karcinom prostaty je asi trojnásobné, a etnický původ, nejvyšší incidence karcinomu prostaty je u amerických černochů, vyšší je také u indoevropské populace. V současné době neexistuje jeden konkrétní test, který by nám potvrdil či vyvrátil přítomnost karcinomu prostaty a zároveň nás informoval o pokročilosti a umístění karcinomu. Jedná se tedy spíše o soubor vyšetření, která lze rozdělit na ta, která vedou k podezření na karcinom prostaty (vyšetření per rektum a hladiny PSA), vyšetření, která jej histologicky potvrdí (transrektální sonografie s biopsií prostaty) a ostatní, která slouží k určení pokročilosti onemocnění (CT, scintigrafie apod.). [1],[2].

Prostatický specifický antigen (PSA) je současný marker nádorových onemocnění prostaty. Slouží jak ke stanovení diagnózy, tak k určení pokročilosti choroby i monitoringu úspěšnosti léčby, avšak jeho senzitivita (49-91 %) a specifita (68-80 %) nejsou dostatečně vysoké, aby mohl být považován za ideální marker. Z chemického hlediska se jedná o glykoprotein, kódovaný na 19. chromozomu, podílející se na likvefakci spermií, jenž je vylučován epiteliálními buňkami prostaty, jak normálními, tak nádorovými. PSA se vyskytuje v krvi, z větší části (85%) ve vazbě na bílkoviny krevní plazmy a zčásti jako volný, tzv. fPSA. Zvýšená hladina PSA v krvi tedy signalizuje jakoukoliv abnormalitu prostaty, nejen karcinom. Jako normální množství PSA v krvi je obvykle považována koncentrace 0-4 ng/ml, přesto některé druhy testu mají horní limit normálu již 2,5 ng/ml. Většina mužů s karcinomem prostaty má hladinu PSA v rozmezí 10 až 20 ng/ml, avšak nejsou neobvyklé ani hodnoty v řádu stovek nebo dokonce tisíců. Jednou z látek, jejichž potenciál pro využití v diagnostice karcinomu prostaty je sarkosin.[9]. Sarkosin v současnosti v centru zájmu.



Obrázek č.1.: Strukturální vzorec sarkosinu

Sarkosin- $\text{CH}_3\text{NHCH}_2\text{COOH}$, byl poprvé izolován a pojmenován německým chemikem Justusem von Liebigem v roce 1847. Je to přírodní, netoxická, bezbarvá pevná látka patřící do skupiny aminokyselin, jenž má sladkou chuť a je rozpustná ve vodě. V lidském těle vzniká jako meziprodukt metabolismu cholinu na glycin, je to tedy methylderivát glycinu, někdy nazývaný N-methylglycin. V malém množství se vyskytuje ve svalcích i jiných tělních tkáních. I v případě raných stadií vývoje nádoru je sarkosin cenným vodičkem. Nejméně cenné je i to, že ve vzorcích odebraných zdravým pacientům nebyl vůbec přítomen. Tím se minimalizuje pravděpodobnost „falešného poplachu.“ Podle zveřejněných výsledků je sarcosin podstatně lepší indikátor postupující rakoviny než tzv. prostatický antigen (protilátka), jehož přítomnost v krvi se testuje dnes. Z medicínského hlediska by bylo ideální, kdyby byli muži po padesátce vyšetřováni každoročně. Představa, že v případě podezření na nádor lékař vzorek prostaty odebere jehlou přes konečník, nahání většině mužů husí kůži, která nemizí ani po ujištění, že biopsie je téměř bezbolestná. Příčinu zvratu vývoje normální buňky v nádorovou zatím přesně neznáme. Není jasné, proč někdy nádor roste jen zvolna a jindy je agresivní. Nezhoubný typ nádoru pacienta omezuje minimálně a po léta se příliš nemění. Stává se, že pacienti s mírnějším typem podstupují chirurgické zákroky a ozařování zbytečně. Rozlišení obou variant je totiž velmi obtížné. Sarkosin upozorňuje právě na agresivní nádory, ukončí se nadměrná léčba pacientů, je to velký krok na cestě k vývoji jednoduchého testu na rakovinu prostaty. Přítomnost v moči látky (sarkosinu), která s vysokou pravděpodobností signalizuje přítomnost nádoru, ulehčí včasnou diagnózu. Ve studii zveřejněné v časopisu Nature v roce 2009, bylo publikováno, že sarkosin vyskytoval pouze u pacientů s karcinomem prostaty, jeho obsah výrazně vyrostl a poukazoval na agresivní nádory, při měření v moči. [4],[6].

Hlavním cílem této práce bylo optimalizovat metodu pro rychlé a spolehlivé stanovení sarkosinu v různých biologických vzorcích. Analyzovat hladinu sarkosinu a další biologické parametry ve vzorcích moči pacientů i kontrolní skupiny. Zkoumat vliv přísadků různých látek a teploty na hladinu sarkosinu a také vliv přísadků sarkosinu na životnost rakovinných prostatických buněk.[7],[8].

MATERIÁL A METODIKA

Všechny použité chemikálie byly zakoupeny od firmy Sigma-Aldrich Spojené Státy Americké, spol. s r.o. ve standardní p.a. čistotě. Pro přípravu všech roztoků byla použita destil. voda Milli-Q. Pro HPLC bylo použito 6 pracovních roztoků (tab. č. 1).

$C_6H_8O_7$	11.11g	10g	10.53g	-
$C_6H_5Na_3O_7$	4.04g	5.6g	9.6g	19.6g
NaCl	9.25g	8.36g	18g	52.6g
H_3BO_3	-	-	-	2.05g
N_3Na	0.1g	0.1g	0.1g	0.1g
Thiodiglikol	2.5ml	2.5ml	2.5ml	-

Tabulka č. 1 – Sodno – citrátové pufrý pro Analyzátor aminokyselin AAA 400 (na 1000ml)

Biologické vzorky

Buněčné lyzáty - Pro analýzu sarkosinu byly použity buněčné lyzáty rakovinných prostatických

buněk linie 22Rv1 (odvozená z xenograftu pasážovaného na kastrovaných myších) připravených v laboratořích lékařské fakulty Masarykovy univerzity. Buňky byly pěstovány v živném médiu RPMI-1640 obohaceném o 10% FBS a antibiotika (penicilin, streptomycin). Uchovávány byly v Termoboxu při teplotě 37 °C s 5% přísunem CO_2 . Po prvním dosažení 50 až 60% konfluence došlo k výměně média. Po zhruba 24 hodinách od této výměny bylo médium opět vyměněno, tentokrát však bylo nové médium obohaceno o 10, 150 a 500 μM sarkosin, díky tomu tedy vznikly 3 odlišné vzorky buněk. Zhruba za 72 hodin od tohoto rozdělení došlo k 80 – 90% konfluenci a buňky již byly připraveny k závěrečnému sklizení. U buněk s přidavkem sarkosinu následně byli změřeny pomocí imunochemického analyzátoru AIA-600- metoda EIMA, testosteron, PSA a pomocí aminoanalyzátoru AAA-400 koncentrace sarkosinu.

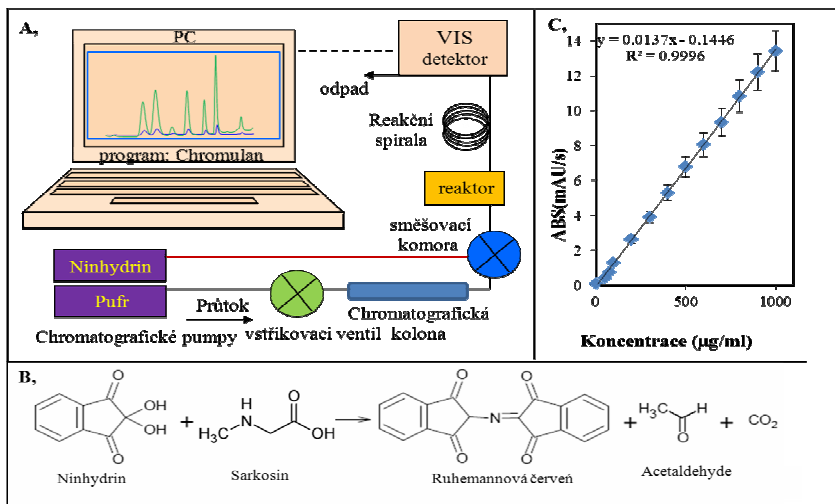
Vzorky moči

Pro analýzu sarkosinu i jiných biologických hodnot bylo použito celkem 37 vzorků mužské moči; 23 kontrol (zdraví dobrovolníci ve věku 17 – 31 let), 3 vyléčení (muži u nichž byl karcinom prostaty v minulosti potvrzen, ale po podstoupení léčby se v jejich těle, podle v současnosti používaných testů, již nevyskytuje), 11 pacientů (z Urologické kliniky FN u sv. Anny). Všechny biologické vzorky byly použity se souhlasem etické komise FN u sv. Anny.

Chemikálie použité pro interakce sarkosinu

Všechny chemikálie použité pro interakce sarkosinu byly zakoupeny od firmy Sigma-Aldrich Spojené Státy Americké, spol. s r.o. ve standardní p.a. čistotě. Pro přípravu roztoků byla použita voda Mili-Q. Pro interakce bylo použito 9 pracovních roztoků: glukóza, kreatinin, uracil, chlorid sodný, kyselina močová, glycin, prolin, albumin, uracil. K množství 100 μM sarkosinu bylo následně přidáno 9 pracovních roztoků o koncentracích 1-10mM. Byli provedené měření pomocí

aminoanalyzátoru - AAA-400, (obr. č. 2). Cílem daného experimentu bylo zjistit vliv různých látek na posun retenčního času a na plochu sarkosinu.



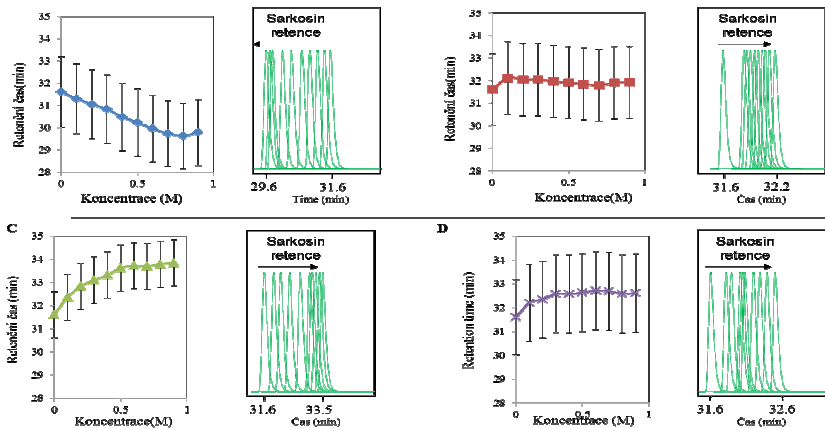
Obrázek č. 2.: A) Schéma HPLC- AAA 400; B) Post-kolonová derivatizace sarkosinu; C) Kalibrační křivka sarkosinu.

K detekci sarkosinu byla použita ionexová kapalinová chromatografie s fotometrickým detektorem (VIS). Mobilní fází tvořily sodno-citrátové pufr (viz Chemikálie). Stacionární fází je ionex s kyselou funkční skupinou HSO_3^- . K separaci vzorku dochází na koloně naplněné ionexem. Kladně nabitá aminokyselina aminokyselin se reverzibilně adsorbuje na záporně nabitou sulfoskupinu. Změnou podmínek, většinou pH, iontové síly a teploty, dochází k postupnému oddělování složek směsi. Jako první se z kolony vymývají aminokyseliny s nejnižším isoelektrickým bodem, tedy ty nejzásaditější. Postupným zapojováním méně kyselých a více koncentrovaných pufrů dochází k postupnému oddělení všech složek vzorku. Rovnoměrnému vymývání z kolony dopomáhá zvýšení teploty tam, kde by byla mezera mezi jednotlivými aminokyselinami opouštějícími kolonu příliš velká. Po eluci aminokyselin příslušného vzorku následuje regenerace kolony pomocí promývání roztokem 0,2 M NaOH. Po výstupu z kolony jsou již oddělené aminokyseliny míseny s ninhydrinovým činidlem, se kterým následně při zvýšené teplotě reagují v průtočném reaktoru. Tento proces se nazývá post-kolonová derivatizace (obr. č. 2). Po výstupu z reaktoru je vzniklý barevný produkt reakce, v případě sarkosinu purpurově zbarvený komplex, tzv. Ruhemannova červeň, detekován pomocí absorpčního fotometrického detektoru. Detektor registruje změnu absorbance při dvou vlnových délkách, v případě sarkosinu při vlnové délce 570 nm. Počítačovým programem CHROMULAN vytvořený záznam, chromatogram, představuje závislost absorbance na čase. Tento záznam je tvořen elučními křivkami, píky, jejichž

poloha (retenční čas) určuje konkrétní aminokyselinu a jejich plocha je přímo úměrná koncentraci aminokyseliny.

VÝSLEDKY A DISKUZE

Při sledování interakci sarkosinu různými látkami došlo k víc či méně k změnám retenci a plochy po přidání NaCl, glycinu, prolinu a kyselině močové. (obr. č. 3)



Obrázek č.3.: Změna retenčního času sarkosinu po přidání různých koncentrací: A) NaCl, B) Kyselina močová, C) Prolin, D) Glycin

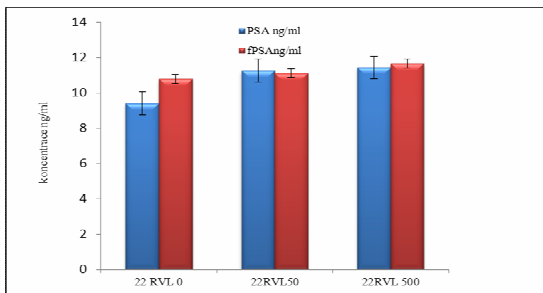
Přístroj AAA 400 je primárně optimalizován pro analýzu esenciálních aminokyselin v biologických vzorcích. Metoda poskytuje vysokou separační účinnost a reprodukovatelnost stanovení (RSD = 2 %). Jedním z prvních úkolů práce bylo ověřit, zda je tento přístroj vhodný pro stanovení sarkosinu, pro které není specificky určen.

věk pacientů	sarkosin (μM)	věk kontrolní skupiny	sarkosin (μM)
62	1480	17	ND
64	770	19	ND
65	830	21	ND
67	640	22	ND
70	337	20	ND
71	321	19	ND
72	121	19	ND
73	530	22	ND
74	186	23	ND
75	150	24	ND
76	190	22	ND

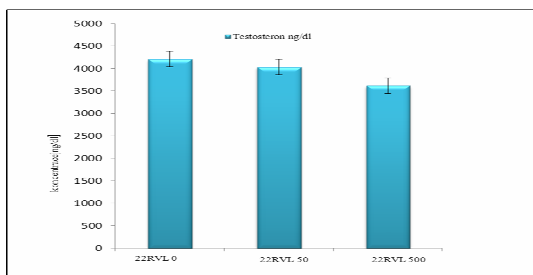
Tabulka č. 2.: Koncentrace sarkosinu u pacientů s karcinomem prostaty a kontrolní skupiny.

Před analýzu sarkosinu pomocí Analyzátoru aminokyselin AAA 400 byl každý vzorek 10x naředěn v pufru (Thidioglikol-5ml, N_3NaO , 10g, NaCl -11,50g, $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$, -14g na 1000 ml) a následně byla takto vzniklá směs promíchána na Vortexu. V tabulce. č. 2 jsou sumarizovány výsledky množství sarkosinu u skupiny kontrolní a u skupiny pacientů s karcinomem prostaty. Z uvedených dat lze soudit, že hladina sarkosinu u mužů s pozitivní diagnózou karcinomu prostaty je signifikantně zvýšená ve srovnání s hladinou u kontrolních vzorků.

Připravené buňky byly naředěny v poměru 1:4 ve fosfatovém pufru $\text{pH}7(\text{NaH}_2\text{PO}_4$ -9,078g, Na_2HPO_4 -11,876g na 1000ml H_2O) a podrobené analýze na imunochemickém analyzátorovi AIA-600, byly změřeny koncentrace testosteronu (obr.č 5), PSA a fPSA (obr. č 4). Z uvedených dat lze soudit, že sarkosin neměl výrazný vliv na koncentrace PSA a fPSA, na rozdíl od koncentrace testosteronu, kde můžeme vidět klesající trend.



Obrázek č.4.: Koncentrace PSA a fPSA u linii 22RVL s přidavkem sarkosinu 0-500 μ M



Obrázek č.5.: Koncentrace testosteronu u linii 22RVL s přidavkem sarkosinu 0-500 μ M

ZÁVĚR

Bylo potvrzeno, že sarkosin je jedním z potenciálních markerů, detekovatelných v moči, u pacientů s nádorovým onemocněním prostaty. V současnosti však existuje mnoho diametrálně odlišných vědeckých názorů, zda ho lze anebo nelze takto využít. V této práci byla studována možnost stanovení sarkosinu pomocí separační metody - vysokoúčinné kapalinové chromatografie s ionexovou separací. Bylo zjištěno, že pro detekci sarkosinu, v tak složité matrici jako je moč, se jako vhodnější jeví chromatografie. Dále bylo zjištěno, že s přibývajícím koncentrací sarkosinu přidaného do živného média rakovinových prostatických buněk klesá hladina testosteronu ale na hladinu PSA a fPSA nemá tak výrazný vliv. Nejvýraznější vliv na retenci a plochu sarkosinu měli NaCl, glycin, prolin a kyselina močová. Výsledky experimentální práce vykazují slibný trend využití sarkosinu pro diagnostiku nádorových onemocnění prostaty, ale je potřeba ještě mnoho dalších studií, než bude možno sarkosin využívat pro běžnou klinickou diagnostiku.

LITERATURA

- [1] Jamaspishvili T, Kral M, Khomeriki I, J.: PROSTATE CANCER AND PROSTATIC DISEASES, 13 (2010), 12-19,1.
- [2] Gonzalez DE, Covitz KMY, Sadee W, J.: CANCER RESEARCH, 58(1998), 519-525,3.
- [3] WoganGN, Paglialunga S, Archer MC.J: CANCER RESEARCH, 35 (1975), 1981-1984 , 8.
- [4] Sreekumar A, Poisson LM, Rajendiran TM, et al.: Nature (2009), 457, 910-914
- [5] Lucarelli G, Larocca A, Fanelli M, et al. EUROPEAN UROLOGY SUPPLEMENTS (MAR 2011) 10, 2, 205-205
- [6] Cao DL, Ye DW, Zhang HL, et al. PROSTATE (MAY 15 2011) 71, 7, 700-710
- [7] Issaq HJ, Waybright TJ, Veenstra ELECTROPHORESIS (APR) 32 Issue: 9, SI, 967-975
- [8] Jentzmik F, Stephan C, Lein M, et al. JOURNAL OF UROLOGY (FEB 2011), 185, 2, 706-711
- [9] THANIGASALAM, R. et al., Prostate-specific antigen velocity (PSAV): a practical role for PSA? Anz Journal of Surgery, 2009, 79 (10), s. 703-706